

# 子宮内膜癌における腫瘍血管新生, Hepatocyte Growth Factor, およびc-Metの発現

著者	我妻 理重
学位授与機関	Tohoku University
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/54968">http://hdl.handle.net/10097/54968</a>



博士論文

子宮内膜癌における腫瘍血管新生, Hepatocyte Growth Factor,  
および c-Met の発現

東北大学医学部附属病院産婦人科

我妻理重



①

## 博士論文

### 子宮内膜癌における腫瘍血管新生, Hepatocyte Growth Factor, および c-Met の発現

東北大学医学部附属病院産婦人科

我妻理重



## 1. 要約

〔目的〕腫瘍の増殖・転移において腫瘍血管新生は重要な役割を担っていると考えられている。今回の研究では、腫瘍組織内における微小血管数、HGF および c-Met の発現が、子宮内膜癌の予後にどのように関係しているかを明らかにすることを目的とした。

〔対象と方法〕1991 年から 1995 年の間に、東北大学医学部附属病院およびその関連病院にて手術を施行した子宮内膜癌 93 症例において後方視的に検討を行った。抗 von Willebrand factor 抗体を用いた免疫組織化学染色法により血管内皮細胞を同定し、腫瘍組織内で血管密度の高い部位  $0.90 \text{ mm}^2$  当たりの最高血管数を微小血管数とし腫瘍血管新生の指標とした。また、HGF、c-Met 蛋白発現は、それぞれ抗 HGF  $\alpha$  抗体、抗 c-Met 抗体を一次抗体とし免疫組織化学染色を行い癌細胞の 1/3 以上染色されたものを陽性とした。

〔結果〕微小血管数 110 以上の高値群と 110 未満の低値群に分けて各予後因子との関係をみると、進行期 III+IV 期、分化度 G3、リンパ節転移陽性例において微小血管数高値群の割合が有意に高くなった。さらに群別の生存曲線を比較すると、高値群の生存期間の有意な短縮を認めた。HGF 陽性を呈した症例の割合は、進行期 III+IV 期、分化度 G3、リンパ節転移陽性、そして筋層浸潤  $>1/2$  において高くなる傾向を示した。さらに HGF 陽性例は生存期間が短縮する傾向を示したが、そのいずれにおいても有意な差は認められなかった。一方、c-Met 陽性例は進行期 III+IV 期、分化度 G3 において有意に増加し、その生存期間は有意に短縮した。HGF および c-Met の発現と微小血管数との関係をみると HGF 陽性例および c-Met 陽性例において微小血管数の有意な増加が認められた。微小血管数、HGF、c-Met を含めた予後



因子と予後との関係を多変量解析にて検討した。その結果、進行期、分化度、筋層浸潤、微小血管数が独立した予後因子となった。

〔結論〕子宮内膜癌において腫瘍血管新生と c-Met 発現は重要な予後決定因子であった。これらの予後因子を検討することにより転移・再発の高危険群を抽出し、その高危険群に対し血管新生阻害剤による治療法が有力な癌治療法となる可能性が期待される。

## II. 研究背景

腫瘍は栄養、酸素などの供給を宿主に依存している。そのため、固形腫瘍がある一定の大きさ（直径 1～2 mm 以上）から急速に増殖する場合、腫瘍血管新生が必要であるといわれている<sup>1)</sup>。血管新生の過程は、基底膜と細胞外基質の消化、血管内皮細胞の遊走と増殖、血管内皮の管腔形成と血管網の形成という 3 つのステップから成っている<sup>2)</sup>。腫瘍内の微小血管数は、これら血管新生の過程の総合的な指標と考えられており、最近では、乳癌<sup>3,4,5,6,7)</sup>、肺癌<sup>8,9)</sup>、頭頸部癌<sup>10,11)</sup>、子宮内膜癌<sup>12)</sup>、卵巣癌<sup>13)</sup>といった腫瘍において、血管内皮細胞を免疫組織化学染色法で同定することにより微小血管数を定量化する試みがなされている。von Willebrand factor (VWF) もしくは第 VIII 因子関連抗原は、血管内皮細胞で生成される蛋白であり、それに対する抗体は内皮細胞の免疫組織化学染色に最もよく使用されている。

腫瘍血管新生は、腫瘍および腫瘍関連マクロファージより分泌される種々の血管新生誘導因子により引き起こされる<sup>1,14)</sup>。acidic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor<sup>15,16)</sup>、vascular endothelial growth factor<sup>17)</sup>は血管新生誘導因子としてよく知られているが、その他にも、transforming growth



factor- $\alpha$ ,  $\beta$ , platelet-derived endothelial cell growth factor, vascular permeability factor, folliculistellate-derived growth factor, angiotropin, angiogenin, tumor necrosis factor- $\alpha$ , urokinase-type plasminogen activator といった数多くの誘導因子が存在する<sup>1,14,18,19,20</sup>。

最近の研究で, hepatocyte growth factor (HGF)もまた強力な血管新生誘導因子であることが判明した<sup>21,22</sup>。HGF は当初, 肝細胞の有糸分裂促進物質として同定され<sup>23,24</sup>), その後, 上皮細胞を分散させ運動を亢進させる因子 scatter factor と同一物質であることが明らかとなった<sup>25</sup>。HGF はヘパリン結合糖蛋白で, 60 kD の $\alpha$ -chain と 30 kD の $\beta$ -chain とから成り<sup>26</sup>), クリングル蛋白ファミリーに属している<sup>24</sup>。HGF は, 細胞分裂促進作用, 運動促進作用, 形態形成促進作用といった多くの生理作用を有しており, 多様な組織・器官の形成, 維持, 再生に関与する多面的機能因子であることが知られている<sup>27,28</sup>。HGF のレセプターは *c-met* 癌原遺伝子がコードする膜結合型チロシンキナーゼ分子(*c-Met*)<sup>29</sup>)であり, 145 kD の $\alpha$ -chain と 40 kD の $\beta$ -chain とから成る糖蛋白である。

### III. 研究目的

今回の研究の目的は, 腫瘍組織内における微小血管数, HGF および *c-Met* の発現が, 子宮内膜癌の予後にどのように関係しているかを明らかにすることである。

### IV. 研究方法

#### 1. 対象



1991年から1995年の間に、東北大学医学部附属病院およびその関連病院にて手術を施行した子宮内膜癌 93 症例において後方視的に検討を行った。組織型はすべて類内膜型腺癌であり、腺扁平上皮癌、漿液性、明細胞腺癌といった他の組織型は除外した。年齢の中間値は 56 歳であった（範囲、29-79 歳）。症例の臨床病理学的背景は表 1 の如くであり、手術進行期分類および組織学的分化度は 1988 年の International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) の分類<sup>30)</sup>に基づいて決定した。さらに、子宮筋腫の診断にて摘出した正常子宮内膜 14 例に対して、HGF および c-Met の発現を検討した。

子宮内膜癌 93 症例に対して、子宮全摘術、両側付属器切除術、骨盤リンパ節郭清術、腹腔内洗浄細胞診を施行し、転移巣が存在する場合は可及的腫瘍切除を行った。手術進行期 Ic 以上、組織学的分化度 G3、脈管侵襲陽性のいずれかを認めた場合は、シクロホスファミド、ドキソルビシン、シスプラチン併用化学療法もしくは放射線療法を追加した。

## 2. 微小血管染色および微小血管数測定

摘出標本は直ちに 4%パラホルムアルデヒド (pH 7.4) にて 4℃、18 時間固定した後、パラフィンにて包埋した。そのヘマトキシリン・エオジン染色標本にて筋層浸潤が最も深く認められる切片一つを、腫瘍の代表切片として微小血管染色に用いた。微小血管染色には血管内皮細胞に存在する VWF に対してストレプトアビジン・ビオチン法 (Histofine; Nichirei Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いた免疫組織化学染色により以下の如く行った。

パラフィン包埋ブロックを 3  $\mu$ m の厚さに薄切し、シランコーティングのスライドガラスにマウントした。脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼ阻止として 0.3%



過酸化水素加メタノールに室温, 15 分浸した. 次に, 0.1%トリプシン (Sigma Co. Ltd., St. Louis, MO) に 15 分浸し抗原の賦活化を行った後, 1%正常ウサギ血清に室温, 30 分反応させた. 続いて, 30 倍希釈の抗ヒト VWF 抗体 (マウスモノクローナル抗体; Dako A/S, Glostrup, Denmark) に 4°C, 18 時間反応させた. ビオチン化二次抗体に室温, 30 分反応させた後, ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンに室温, 30 分浸した. 最後に 0.06 mM 3,3-diamino-benzidine (DAB)にて 15 分発色を行った. 核染はヘマトキシリンにて行った.

微小血管数の測定は, 患者の臨床病理学的背景を知らされていない観察者によって行われた. まず, VWF 陽性細胞を血管内皮細胞とし, 低倍率 (40 倍および 100 倍) にて標本中最も血管密度の高い部位を 3 カ所選びだした. 次に, 画像解析装置 (Luzex; Nireco, Tokyo, Japan) を用いてそれぞれの場所における  $0.90 \text{ mm}^2$  当たりの血管数を算出し, その 3 カ所の中で最大のものを微小血管数とした.

### 3. HGF および c-Met の免疫組織化学染色

HGF および c-Met に対する免疫組織化学染色は, それぞれ抗 HGF  $\alpha$  抗体 (ウサギポリクローナル; IBL, Gumma, Japan), 抗 c-Met 抗体 (ウサギポリクローナル; IBL, Gumma, Japan) を一次抗体とし, 微小血管染色で使用したブロックと同じものを用いて以下の如く行った. 0.1%トリプシンにて抗原の賦活化を行った後, 1%正常ヤギ血清に室温, 30 分反応させた. 次に 20 倍希釈 ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) の抗 HGF  $\alpha$  抗体もしくは抗 c-Met 抗体に 4°C, 18 時間反応させ, 続いてビオチン化二次抗体に室温, 30 分浸した. その他の過程は, DAB 発色時間が 5 分であったこと除いて微小血管染色の方法と同様であった. HGF および c-Met の吸収試験として, HGF 合成蛋白 (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA) と抗 HGF 抗体との混合液, および c-Met 合



成蛋白 (IBL, Gumma, Japan) と抗 c-Met 抗体との混合液を 4°C, 18 時間反応させた。次に, それら混合液の遠心分離後の上清を一次抗体として用いた。HGF, c-Met の陽性コントロールとしてはヒト胎盤を, 陰性コントロールとしてそれぞれの一次抗体を除いたものを用いた。HGF, c-Met の免疫染色の評価は臨床病理学的背景を知らされていない状態で行われ, 癌細胞の 1/3 以上が染色されたものを陽性, それ未満を陰性と判断した。この分類は以前に報告された論文<sup>31)</sup>に基づいたものである。

#### 4. 統計学的解析

統計学的解析は StatView 4.5 software (Abacus Concept, Inc., Berkeley, CA) もしくは SPSS-X statistical computer package (SPSS Inc., Chicago, IL) を用いた。分割表の検定には  $\chi^2$  乗検定を, 連続変数の検定には Mann-Whitney *U* test を用いた。また, 生存曲線は Kaplan-Meier 法により作製し, その検定には log rank test を行った。さらに, Cox の比例ハザードモデルによる多変量解析を行った。 $P < 0.05$  を統計学的に有意であると考えた。

#### V. 研究結果

1996 年 10 月 31 日の時点で, 観察期間の中央値は 27 か月 (範囲, 2-61 か月) であった。93 例中 21 例が子宮内膜癌再発により死亡し, 初回治療から死亡までの期間は 2~61 か月, その中間値は 18 か月であった。生存例のうち 64 例は無病生存, 残りの 8 例は脱落症例であった。

抗 VWF 抗体は血管内皮細胞に強陽性を示し, 血管密度は癌近傍の間質内において高くなる傾向を示した (図 1)。微小血管数の中央値は 111 (範囲, 31-250), 平均値は  $114.7 \pm 44.0$  (±標準偏差) であった。各予後因子別の微小血管数を表 2 に



示した。それによると進行期 III+IV 期，分化度 G3，リンパ節転移陽性例において微小血管数の有意な増加が認められた。次に，微小血管数 110 以上の高値群と 110 未満の低値群に分けて各予後因子との関係を見てみると，進行期 III+IV 期，分化度 G3，リンパ節転移陽性例において微小血管数高値群の割合が有意に高くなった（表 3）。さらに群別の生存曲線を比較すると，高値群の生存期間の有意な短縮を認めた（図 2）。

HGF と c-Met の発現は正常子宮内膜および子宮内膜癌において検討した。HGF の陽性反応は腺癌細胞の細胞質および核（図 3），さらに子宮平滑筋細胞，血管平滑筋細胞に認められた。また正常子宮内膜腺細胞も HGF 陽性であった。HGF 合成蛋白による抗 HGF 抗体吸収後の免疫染色では陽性細胞は認められなかった。HGF 陽性例は正常子宮内膜，内膜癌症例の大部分にみられ（表 4），双方間に染色強度の差は認められなかった。一方，c-Met の陽性反応は腺癌細胞の細胞膜および細胞質（図 4），また正常子宮内膜腺細胞に認められた。c-Met 合成蛋白による抗 c-Met 抗体吸収後の免疫染色では陽性細胞は認められなかった。c-Met 陽性例は正常子宮内膜では 13.3%（2/14；陽性を示した 2 例とも増殖期内膜）であったのに対し，内膜癌では 63.4%（59/93）とより高率に認められた（表 4）。c-Met 陽性を示した 59 例中 57 例は HGF に対しても陽性を呈した。

子宮内膜癌において HGF 陽性を呈した症例の割合は，進行期 III+IV 期，分化度 G3，リンパ節転移陽性，そして筋層浸潤  $>1/2$  において高くなる傾向を示した。さらに HGF 陽性例は生存期間が短縮する傾向を示したが，そのいずれにおいても有意な差は認められなかった（表 5，図 5）。一方，c-Met 陽性例は進行期 III+IV 期，分化度 G3 において有意に増加し，その生存期間は有意に短縮した（表 5，図 6）。



HGF および c-Met の発現と微小血管数との関係を表 6 にまとめた。それによると HGF 陽性例および c-Met 陽性例において微小血管数の有意な増加が認められた。

微小血管数, HGF, c-Met を含めた予後因子と予後との関係を, 単変量および多変量解析にて検討した。その結果, 進行期, 分化度, 筋層浸潤, 微小血管数が独立した予後因子となった (表 7)。

## VI. 考察

今回の研究で, 今まで言われてきた予後因子に加え微小血管数および c-Met の発現は, 子宮内膜癌の新しい予後因子であり, さらに微小血管数は子宮内膜癌の独立した予後因子となり得る可能性が示唆された。

腫瘍血管新生を評価するために, 腫瘍の代表的なブロック一個を用いて, その中で最も血管密度の高い部位の微小血管数を算出する手法を用いた。その結果, 微小血管数と進行期, 分化度, リンパ節転移, 生存率との間に有意な関係を認めた。さらに多変量解析にて, 微小血管数は子宮内膜癌の独立した予後因子であることが示された。これらの結果は, 乳癌<sup>3,4,6,32)</sup>, 頭頸部癌<sup>10,11)</sup>, そして肺癌<sup>8,9)</sup>において示されている結果を支持するものである。

ホルマリン抵抗性を示す内皮細胞抗原としては, VWF, 細胞表面マーカー CD31<sup>33)</sup>, CD34<sup>34,35)</sup>などが知られている。Siitonen ら<sup>5)</sup>は, 乳癌においてこれらの抗原に対するそれぞれの抗体の染色性の違いを検討した。その結果, 3つの抗体とも乳癌の血管内皮細胞の免疫染色に有用であったが, 抗 CD31 抗体に比べ, 抗 VWF 抗体および抗 CD34 抗体の方がより良い染色性を示したとしている。この結果に基づき今回の研究では抗 VWF 抗体を使用した。



腫瘍血管新生の評価方法として微小血管数を用いる場合、腫瘍組織中の任意の場所における血管数がよいか、それとも最も血管密度の高い場所の血管数の方がよいかという問題が議論されている。Goulding ら<sup>7)</sup>は、腫瘍切片中の任意の 25 視野を選択し、その平均血管数と予後との関係を検討したが、何の関係も見出せなかったとしている。腫瘍組織中で血管新生が起こる場合、全ての腫瘍細胞が均一に血管新生の方向に進むわけではなく、最も血管新生の強い場所から転移が起こると言われている<sup>4)</sup>。それゆえ、転移能や予後といった腫瘍の性格を判断するためには、腫瘍組織内で血管密度の最も高い場所で評価することが重要であると考えられた。

一方最近では、乳癌において微小血管数と予後因子および予後との間に関係がなかったとする報告もみられる<sup>5,7)</sup>。それらの報告では今回の研究と同様に、代表的な一切片中で血管密度の最も高い部位の血管数を用いて検討している。そして著者らは、腫瘍内の血管数には異質性が存在するため最高の血管密度を探すためには、多数のブロックを用いた検討が必要なのではないかと考察している。確かに、多数のブロックにて検討すべきか、代表的一切片でも充分であるかは、今後の研究課題であると思われる。

最近、HGF や c-Met が卵巣癌<sup>36)</sup>、腎癌<sup>37)</sup>、膀胱癌<sup>38)</sup>、乳癌<sup>39)</sup>、膵癌<sup>31)</sup>、前立腺癌<sup>40)</sup>といった悪性腫瘍の進展に関連しているとの報告がなされている。今回の研究では、c-Met の発現は正常子宮内膜ではわずかにしか認められず、また子宮内膜癌における c-Met 発現は予後悪性因子の一つであった。さらに c-Met 発現症例のほとんどは HGF も発現していることより、HGF と c-Met の同時発現が子宮内膜癌の予後に深く関連しているものと考えられた。HGF の発現は正常子宮内膜、子宮内膜癌の両方に高頻度に認められ、また HGF 発現と予後との間に有意な関連はみられなかった。HGF



発現と子宮内膜癌との関係を検討するには、免疫染色といった定性的方法ではなく、ウェスタンブロット法や enzyme-linked immunosorbent assay といったより定量的方法を用いる必要があると考えられた。

Tominaga<sup>41)</sup>は月経周期各時期の正常子宮内膜の HGF mRNA 発現を検討した。それによると HGF mRNA 発現は増殖期、排卵期には弱く、分泌期に強くなり、月経期にはさらに強くなったと報告している。今回の検討では、HGF 蛋白発現は増殖期、分泌期ともに認められ、また c-Met 蛋白発現は増殖期にのみ認められた。しかし症例数が少ないため、HGF、c-Met が月経周期のどの時期に発現しているか結論をだすにはさらに多くの症例による検討が必要であると考えられた。

HGF 産生細胞の大部分は線維芽細胞や血管平滑筋細胞といった間葉細胞であるが<sup>42,43)</sup>、乳癌や肺癌の癌細胞において HGF mRNA と HGF 蛋白合成の両方が認められたとの報告がある<sup>44,45)</sup>。今回の研究では、正常子宮内膜腺細胞、腺癌細胞、そして子宮および血管平滑筋細胞に HGF 染色がみられた。これらの HGF 陽性細胞において HGF が産生されているのか、それとも c-Met に結合した HGF を認識しているのかを明らかにするため今後 HGF mRNA の発現を検討する必要があると考えられた。

現在まで、子宮内膜癌の予後予測因子を見つけようとする様々な研究がなされている。今回の検討では、微小血管数と c-Met の発現が子宮内膜癌の予後を予測する上で有用であることが示唆された。子宮内膜癌は肺、肝臓、傍大動脈リンパ節といった全身に転移を呈する疾患であるため、手術療法、放射線療法などの局所療法に加え、全身化学療法が必要となってくる。微小血管数や血管新生誘導因子である c-Met といった新しい予後因子を検討することにより、今までの化学療法に加え、血管新生阻害剤による新しい癌治療の導入に役立つものと考えられた。



## VII. 結論

子宮内膜癌において腫瘍血管新生と c-Met 発現は重要な予後決定因子であった。これらの予後因子を検討することにより転移・再発の高危険群を抽出し、その高危険群に対し血管新生阻害剤による治療法が有力な癌治療法となる可能性が期待される。

3) Weidner N, Semple JP, Welch VR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis - Correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324:1-6.

4) Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84:1875-87.

5) Sittone SM, Hsuanalo HK, Rantala IS, Helle MJ, Isola JJ. Comparison of different immunohistochemical methods in the assessment of angiogenesis: lack of prognostic value in a group of 77 selected node-negative breast carcinomas. *Modern Pathol* 1995; 8:745-52.

6) Costello P, McCann A, Carey DN, Devan PA. Prognostic significance of microvessel density in lymph node-negative breast carcinoma. *Hum Pathol* 1995; 26:1181-4.

7) Goulding H, NIK Abdul Rashid NF, Robertson JF, Bell JA, Elston CW, Blamey RW, et al. Assessment of angiogenesis in breast carcinoma: an important factor in prognosis? *Hum Pathol* 1995; 26:1196-200.



## 文献

- 1) Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. Science 1987; 235:442-7.
- 2) Ausprunk DH, Folkman J. Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. Microvasc Res 1977; 14:53-8.
- 3) Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis - Correlation in invasive breast carcinoma. N Engl J Med 1991; 324:1-8.
- 4) Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. J Natl Cancer Inst 1992; 84:1875-87.
- 5) Siitonen SM, Haapasalo HK, Rantala IS, Helin HJ, Isola JJ. Comparison of different immunohistochemical methods in the assessment of angiogenesis: lack of prognostic value in a group of 77 selected node-negative breast carcinomas. Modern Pathol 1995; 8:745-52.
- 6) Costello P, McCann A, Carney DN, Dervan PA. Prognostic significance of microvessel density in lymph node negative breast carcinoma. Hum Pathol 1995; 26:1181-4.
- 7) Goulding H, Nik Abdul Rashid NF, Robertson JF, Bell JA, Elston CW, Blamey RW, et al. Assessment of angiogenesis in breast carcinoma: an important factor in prognosis? Hum Pathol 1995; 26:1196-200.



- 8) Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA.  
Relation of neovascularization to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* 1992; 340:145-6.
- 9) Yamazaki K, Abe S, Takekawa H, Sukoh N, Watanabe N, Ogura S, et al.  
Tumor angiogenesis in human lung adenocarcinoma. *Cancer* 1994; 74:2245-50.
- 10) Gasparini G, Weidner N, Malta S, Pazzo F, Boracchi P, Mezzetti M, et al.  
Intratumoral microvessel density and p53 protein: correlation with metastasis in head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* 1993; 55:739-44.
- 11) Roychowdhury DF, Tseng Jr A, Fu KK, Weinberg V, Weidner N. New prognostic factors in nasopharyngeal carcinoma: tumor angiogenesis and c-erbB2 expression. *Cancer* 1996; 77:1419-26.
- 12) Abulafia O, Triest WE, Sherer DM, Hansen CC, Ghezzi F. Angiogenesis in endometrial hyperplasia and stage I endometrial carcinoma. *Obstet Gynecol* 1995; 86:479-85.
- 13) Gasparini G, Bonoldi E, Viale G, Verderio P, Boracchi P, Panizzoni GA, et al. Prognostic and predictive value of tumour angiogenesis in ovarian carcinomas. *Int J Cancer* 1996; 69:205-11.
- 14) Polverini PJ, Leibovich SJ. Induction of neovascularization in vivo and endothelial proliferation in vitro by tumor associated macrophages. *Lab Invest* 1984; 51:635-42.



- 15) Kandel J, Bossy-Wetzel E, Radvanyi F, Klagsbrum M, Folksman J, Hanahan D. Neovascularization is associated with a switch to the export of BFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell* 1991; 66:1095-104.
- 16) Nguyen M, Watanabe H, Budson AE, Richie JP, Folkman J. Elevated levels of the angiogenic peptide basic fibroblast growth factor in urine of bladder cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85:241-2.
- 17) Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in-vivo. *Nature (Lond.)* 1993; 362:841-4.
- 18) Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:4-6.
- 19) Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM. The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. *Cancer Res* 1976; 36:889-94.
- 20) Mandriota SJ, Seghezzi G, Vassalli JD, Ferrara N, Wasi S, Mazzieri R, et al. Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270:9709-16.
- 21) Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, et al. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. *J Cell Biol* 1992; 119:629-41.



- 22) Grant DS, Kleinman HK, Goldberg ID, Bhargava MM, Nickoloff BJ, Kinsella JL, et al. Scatter factor induces blood vessel formation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:1937-41.
- 23) Miyazawa K, Tsubouchi H, Naka D, Takahashi K, Okigaki M, Arakaki N, et al. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 163:967-73.
- 24) Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, et al. Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature (Lond.)* 1989; 342:440-3.
- 25) Weidner KM, Arakaki N, Vandekereckhove J, Weingart S, Hartmenn G, Rieder H, et al. Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:7001-5.
- 26) Gherardi E, Gray J, Stocker M, Perryman M, Furlong R. Purification of scatter factor, a fibroblast-derived basic protein which modulates epithelial interactions and movement. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:5844-8.
- 27) Nakamura T, Teramoto H, Ichihara A. Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:6489-93.



- 28) Tajima H, Mtsumoto K, Nakamura T. Regulation of cell growth and motility by hepatocyte growth factor and receptor expression in various cell species. *Exp Cell Res* 1992; 202:423-31.
- 29) Bottaro DP, Rubin JS, Fallete DL, Chan AML, Kmiecik TE, Vande Woude GF, et al. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the *c-met* proto-oncogene product. *Science (Wash., DC)* 1991; 251:802-4.
- 30) FIGO news. *Int J Gynecol Obstet* 1989; 28:189-93.
- 31) Furukawa T, Duguid WP, Kobari M, Matsuno S, Tsao MS. Hepatocyte growth factor and Met receptor expression in human pancreatic carcinogenesis. *Am J Pathol* 1995; 147:889-95.
- 32) Horak ER, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart N, et al. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesions molecule antibodies, as an indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet* 1992; 340:1120-4.
- 33) Parums DV, Cordell JL, Micklem K, Heryet AR, Gatter CK, Mason DY. JC70: a new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen in routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol* 1990; 43: 752-7.
- 34) Schlingemann RO, Rietveld FJR, deWaal RMW, Bradley NJ, Skene AI, Davies AJS, et al. Leukocyte antigen CD34 is expressed by a subset of cultured endothelial cells and on endothelial abluminal microprocesses in the tumor stroma. *Lab Invest* 1990; 62:690-6.



- 35) Fina L, Molgaard HV, Robertson D, Bradley NJ, Monaghan P, Delia D, et al. Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood* 1990; 75:2417-26.
- 36) Di Renzo MF, Olivero M, Katsaros D, Crepaldi T, Gaglia P, Zola P, et al. Overexpression of the *MET*/HGF receptor in ovarian cancer. *Int J Cancer* 1994; 58:658-62.
- 37) Natali PG, Prat M, Nicotra MR, Bigotti A, Olivero M, Comoglio PM, et al. Overexpression of the met/HGF receptor in renal cell carcinomas. *Int J Cancer (Pred. Oncol.)* 1996; 69:212-7.
- 38) Joseph A, Weiss GH, Jin L, Fuchs A, Chowdhury S, O'Shaugnessy P, et al. Expression of scatter factor in human bladder carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:372-7.
- 39) Yamashita J, Ogawa M, Yamashita S, Nomura K, Kuramoto M, Saishoji T, et al. Immunoreactive hepatocyte growth factor is a strong and independent predictor of recurrence and survival in human breast cancer. *Cancer Res* 1994; 54:1630-3.
- 40) Humphrey PA, Zhu X, Zarnegar R, Swanson PE, Ratliff TL, Vollmer RT, et al. Hepatocyte growth factor and its receptor (c-MET) in prostatic carcinoma. *Am J Pathol* 1995; 147:386-96.
- 41) Tominaga T. Studies on mechanism of embryo implantation. *Acta Obst Gynaec Jpn* 1996; 48:591-603.



42) Rubin JS, Cahn AML, Battaro DP, Burgess WH, Taylor WG, Cech AC, et al. A broad spectrum human lung fibroblast-derived mitogen is a variant of hepatocyte growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:415-9.

43) Rosen EM, Goldberg ID, Kacinski BM, Buckholz T, Vinter DM. Smooth muscle releases an epithelial cell scatter factor which binds to heparin. *In Vitro Cell Dev Bio* 1989; 25:163-73.

44) Tsao MS, Zhu H, Giaid A, Viallet J, Nakamura T, Park M. Hepatocyte growth factor is an autocrine factor for human normal bronchial epithelial and lung carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 1993; 4:571-9.

45) Wang Y, Selden C, Morgan N, Stamp GWH, Hodgson HJF. Hepatocyte growth factor/scatter factor expression in human mammary epithelium. *Am J Pathol* 1994; 144:675-82.



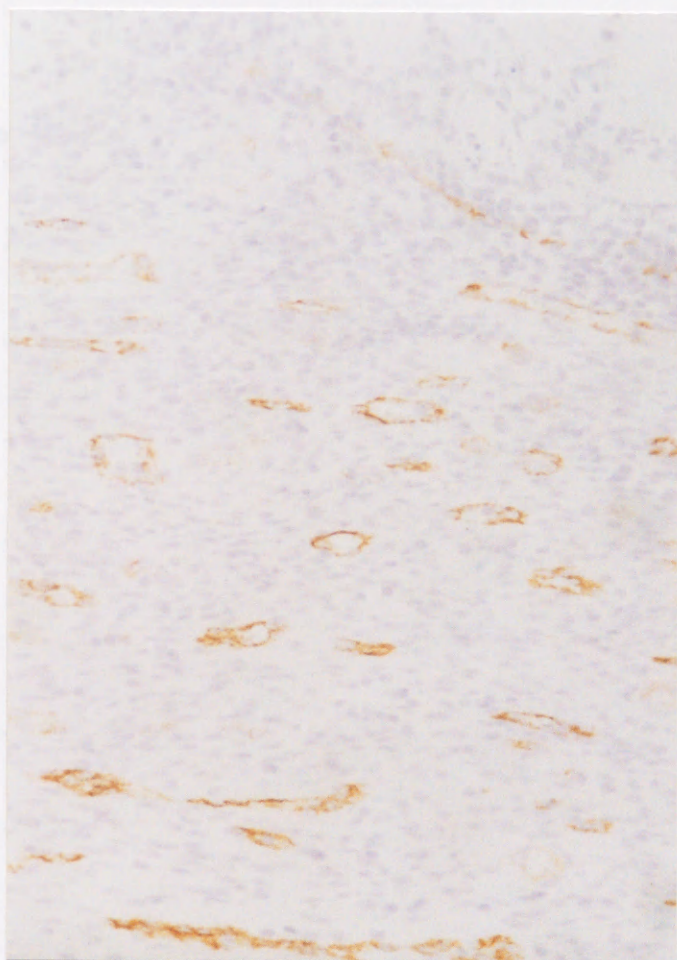


図1. 子宮内膜癌における抗VWF抗体陽性血管内皮細胞. 腺癌 (左) 近傍の筋層内において微小血管密度が高く認められた. (200倍)



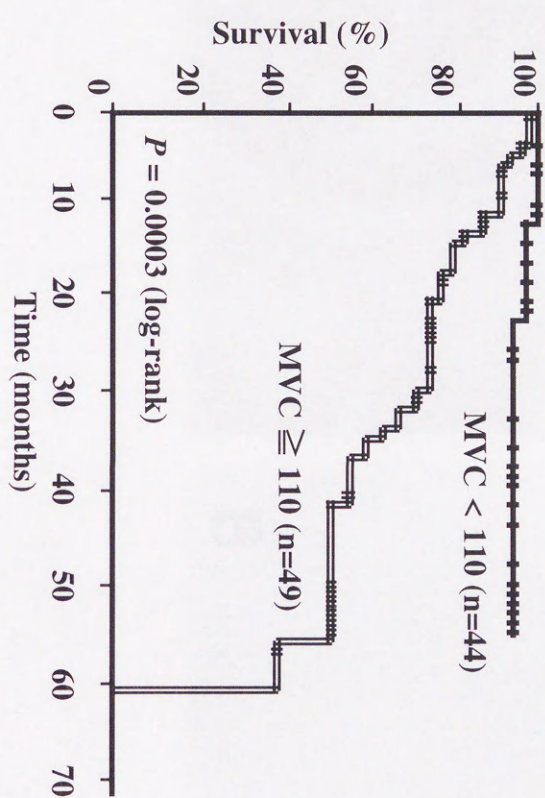


図2. 子宮内膜癌における微小血管数高値群（二重線）と低値群（単線）の生存曲線



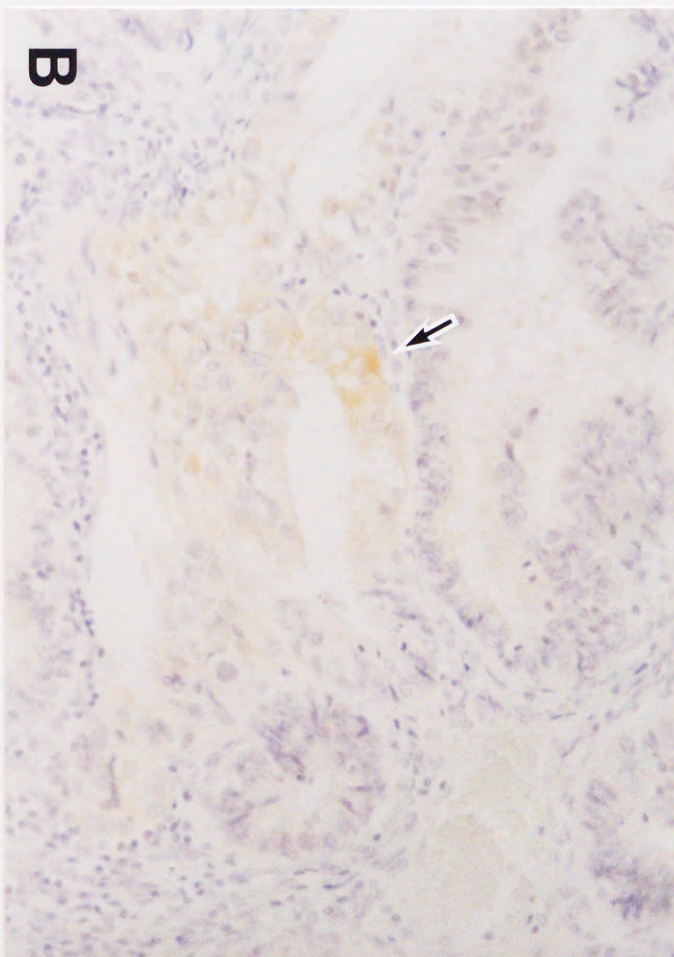
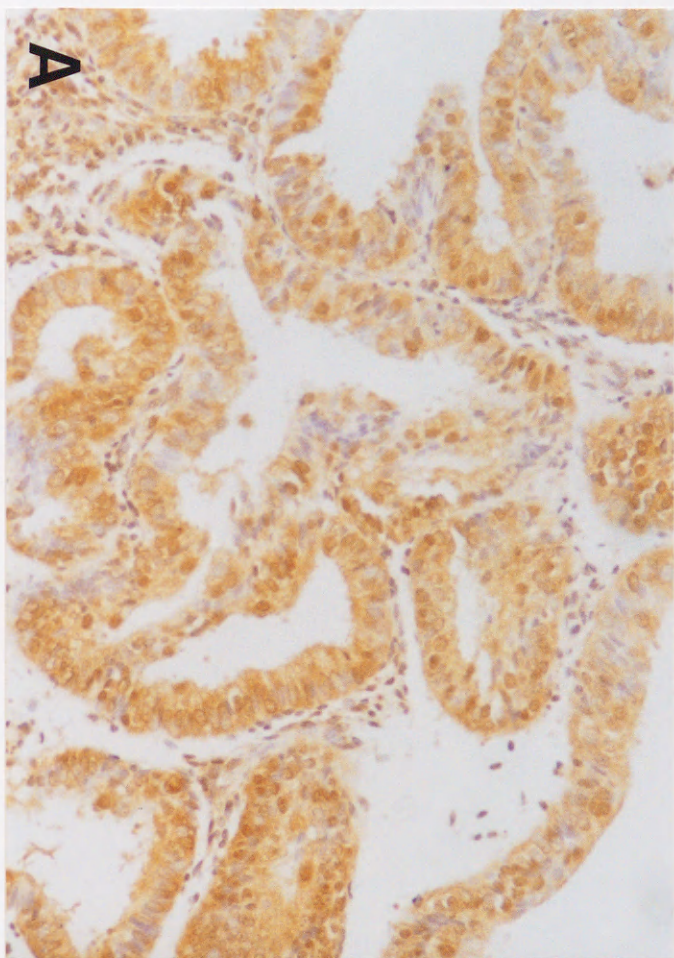


図 3. 子宮内膜癌におけるHGF陽性細胞. (A) ほとんどの腺癌細胞の細胞質および核にHGF陽性所見を認め、陽性と判断した. (B) HGF陽性細胞 (矢印) は腺癌細胞の1/3以下で、陰性と判断した. (200倍)



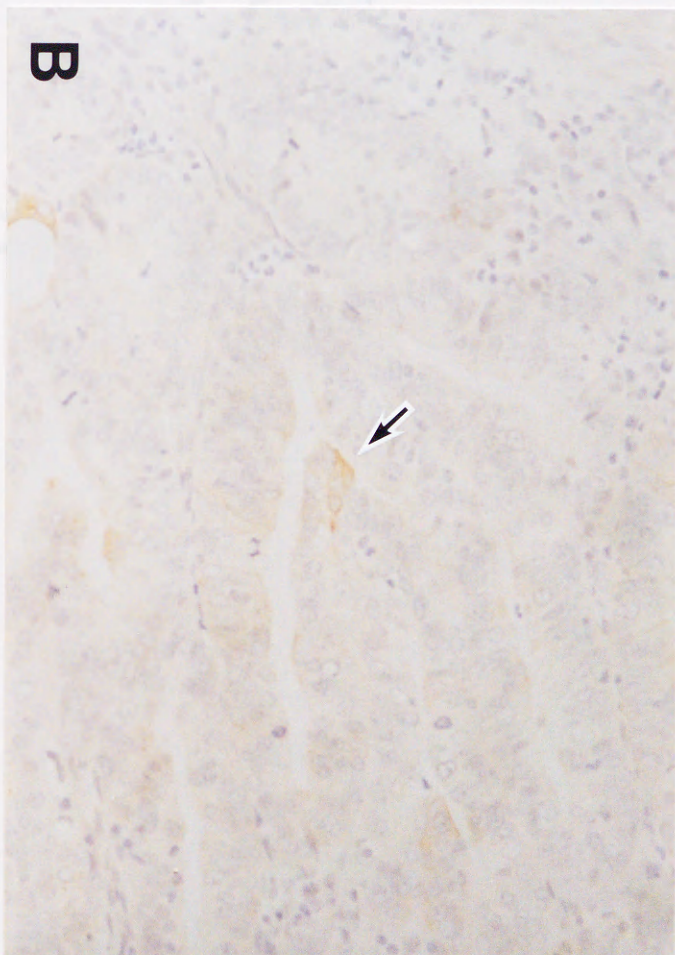
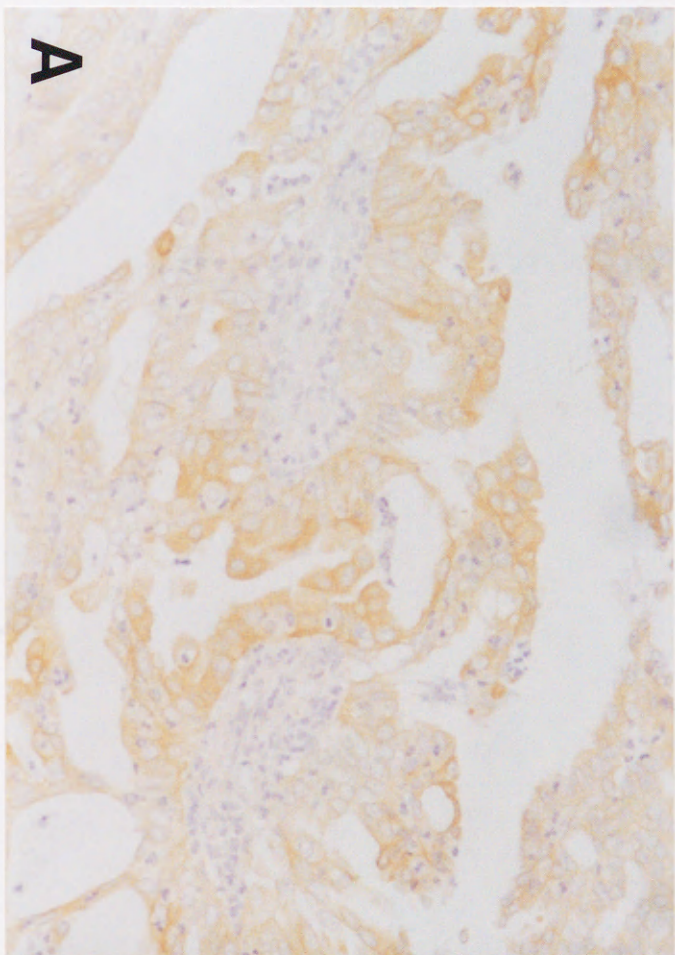


図 4. 子宮内膜癌におけるc-Met陽性細胞. (A) ほとんどの腺癌細胞の細胞膜および細胞質にc-Met陽性所見を認め、陽性と判断した. (B) c-Met陽性細胞 (矢印) は腺癌細胞の1/3以下で、陰性と判断した. (200倍)



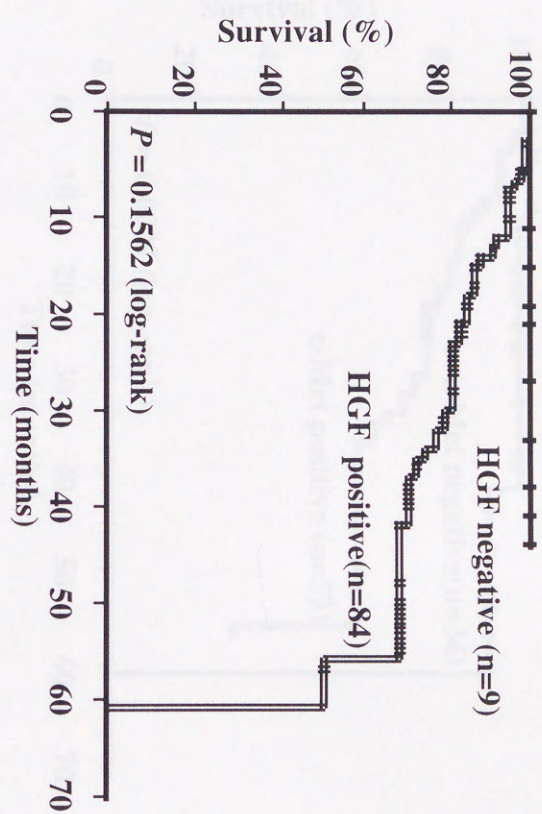


図 5. 子宮内膜癌におけるHGF 陽性例 (二重線) と陰性例 (単線) の生存曲線



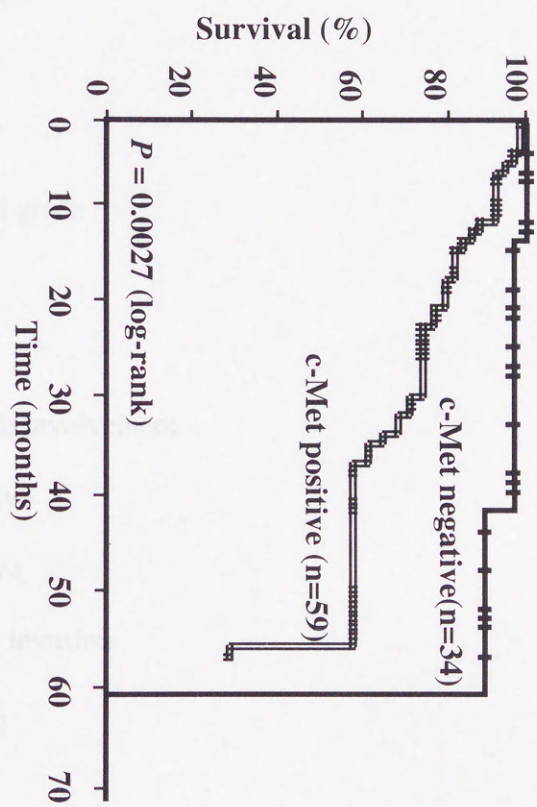


図 6. 子宮内膜癌におけるc-Met 陽性例（二重線）と陰性例（単線）の生存曲線



表 1

子宮内膜癌症例の臨床病理学的背景

Characteristic	No. of patient
Age	
< 50 yr	21
$\geq$ 50 yr	72
Surgical stage	
I+II	65
III+IV	28
Histological grade	
G1+2	73
G3	20
Lymph node involvement	
Negative	71
Positive	22
Myometrial invasion	
$\leq$ 1/2	64
$>$ 1/2	29
Vascular involvement	
Negative	47
Positive	46



表 2

子宮内膜癌における微小血管数の分布

Characteristic	No. of patient	MVC		<i>P</i> value <sup>a</sup>
		Median	Range	
Age				
< 50 yr	21	84	35-194	0.0866
≥ 50 yr	72	116	31-250	
Surgical stage				
I+II	65	97	31-194	0.0039
III+IV	28	127	62-250	
Histological grade				
G1+2	73	102	31-204	0.0222
G3	20	128	51-250	
Lymph node involvement				
Negative	71	97	31-220	0.0020
Positive	22	128	80-250	
Myometrial invasion				
≤ 1/2	64	111	31-204	0.6453
> 1/2	29	116	52-250	
Vascular involvement				
Negative	47	100	31-194	0.0852
Positive	46	118	50-250	

MVC: microvessel count (per 0.90 mm<sup>2</sup>).<sup>a</sup> Mann-Whitney *U* test.



表 3

子宮内膜癌における臨床病理学的予後因子と微小血管数の関係

Characteristic	Number of patients (%)		<i>P</i> value <sup>a</sup>
	MVC < 110	MVC ≥ 110	
Age			
< 50 yr	13 (61.9)	8 (38.1)	0.203
≥ 50 yr	31 (43.1)	41 (56.9)	
Surgical stage			
I+II	37 (56.9)	28 (43.1)	0.009
III+IV	7 (25.0)	21 (75.0)	
Histological grade			
G1+2	40 (54.8)	33 (45.2)	0.012
G3	4 (20.0)	16 (80.0)	
Lymph node involvement			
Negative	40 (56.3)	31 (43.7)	0.004
Positive	4 (18.2)	18 (81.8)	
Myometrial invasion			
≤ 1/2	31 (48.4)	33 (51.6)	0.921
> 1/2	13 (44.8)	16 (55.2)	
Vascular involvement			
Negative	26 (55.3)	21 (44.7)	0.175
Positive	18 (39.1)	28 (60.9)	

MVC: microvessel count (per 0.90 mm<sup>2</sup>).<sup>a</sup> chi-square test.



表 4

子宮内膜における HGF および c-Met の発現

	Total number of specimens	Number of specimens showing positive staining (%)	
		HGF	c-Met
Normal endometrium	14	11 (78.6)	2 (14.3)
Proliferative	5	5 (100)	2 (40.0)
Secretory	4	1 (25.0)	0 (0.0)
Atrophic	5	5 (100)	0 (0.0)
Endometrial carcinoma	93	84 (90.3)	59 (63.4)

Positive staining: more than one-third of the gland or cancer cells showed positive staining.



表 5

子宮内膜癌における臨床病理学的予後因子と HGF および c-Met 発現の関係

Characteristic	Number of patients (%)		<i>P</i> value <sup>a</sup>	Number of patients (%)		<i>P</i> value <sup>a</sup>
	HGF negative	HGF positive		c-Met negative	c-Met positive	
Age						
< 50 yr	2 (9.5)	19 (90.5)	0.695	10 (47.6)	11 (52.4)	0.347
≥ 50 yr	7 (9.7)	65 (90.3)		24 (33.3)	48 (66.7)	
Surgical stage						
I+II	8 (12.3)	57 (87.7)	0.355	29 (44.6)	36 (55.4)	0.026
III+IV	1 (3.6)	27 (96.4)		5 (17.9)	23 (82.1)	
Histological grade						
G1+2	9 (12.3)	64 (87.7)	0.220	33 (45.2)	40 (54.8)	0.002
G3	0 (0.0)	20 (100)		1 (5.0)	19 (95.0)	
Lymph node involvement						
Negative	9 (12.7)	62 (87.3)	0.179	30 (42.3)	41 (57.7)	0.073
Positive	0 (0.0)	22 (100)		4 (18.2)	18 (81.8)	
Myometrial invasion						
≤ 1/2	7 (10.9)	57 (89.1)	0.817	27 (42.2)	37 (57.8)	0.149
> 1/2	2 (6.9)	27 (93.1)		7 (24.1)	22 (75.9)	
Vascular involvement						
Negative	4 (8.5)	43 (91.5)	0.973	21 (44.7)	26 (55.3)	0.153
Positive	5 (10.9)	41 (89.1)		13 (28.3)	33 (71.7)	

HGF negative, c-Met negative: less than one-third of the cancer cells showing positive staining; HGF positive, c-Met positive: more than one-third of the cancer cells showing positive staining.

<sup>a</sup> chi-square test.



表 6

子宮内膜癌におけるHGFおよびc-Met発現と微小血管数の関係

Variable	No. of patients	MVC		<i>P</i> value <sup>a</sup>
		Median	Range	
HGF				
Negative	9	67	31-133	0.0011
Positive	84	116	51-250	
c-Met				
Negative	34	92	31-177	0.0031
Positive	59	122	51-250	

MVC: microvessel count (per 0.90 mm<sup>2</sup>); negative: less than one-third of the cancer cells showing positive staining; positive: more than one-third of the cancer cells showing positive staining.

<sup>a</sup> Mann-Whitney *U* test.



表 7

子宮内膜癌における予後因子の多変量解析

Variable	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	RR	95% CI	P value	RR	95% CI	P value
Age						
< 50 vs. $\geq$ 50 yr	1.758	0.51-6.05	0.3708	-	-	-
Surgical stage						
I+II vs. III+IV	48.866	6.53-365.49	0.0002	12.375	1.05-145.46	0.0454
Histological grade						
G1+2 vs. G3	3.544	1.47-8.57	0.0050	3.449	1.12-10.65	0.0314
Lymph node involvement						
- vs. +	14.165	4.72-42.55	< 0.0001	1.850	0.44-7.70	0.3981
Myometrial invasion						
$\leq$ 1/2 vs. > 1/2	6.983	2.67-18.26	0.0001	3.370	1.13-10.02	0.0289
Vascular involvement						
- vs. +	10.295	2.38-44.50	0.0018	1.064	0.22-5.05	0.9380
Microvessel count						
< 110 vs. $\geq$ 110	9.373	2.16-40.65	0.0028	6.311	1.26-31.63	0.0251
HGF						
negative vs. positive	23.539	0.03-20055.70	0.3589	-	-	-
c-Met						
negative vs. positive	6.891	1.60-29.78	0.0097	2.765	0.54-14.27	0.2244

RR: relative risk; CI: confidence interval; -: negative; +: positive; negative: less than one-third of the cancer cells showing positive staining; positive: more than one-third of the cancer cells showing positive staining.



